

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Juli 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/053711 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 5/861,
5/10, C07K 14/47, 14/075, A61K 48/00, 38/17, G01N
33/53

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15212

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Dezember 2001 (21.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 65 504.1 28. Dezember 2000 (28.12.2000) DE
101 50 945.6 16. Oktober 2001 (16.10.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: HOLM, Per, Sonne [DK/DE]; Meisenstr. 27,
82256, Fürstenfeldbruck (DE).

(74) Anwalt: BOHMANN, Armin, K.; Bohmann & Loosen,
Sonnenstr. 8, 80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ADENOVIRAL SYSTEMS AND THE USES THEREOF

(54) Bezeichnung: ADENOVIRALE SYSTEME UND DEREN ANWENDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid comprising an adenoviral nucleic acid, which also contains a nucleic acid sequence coding for YB-1.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, die zusätzlich eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz umfasst.

WO 02/053711 A2

Adenovirale Systeme und deren Anwendungen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren umfassend adenovirale Nukleinsäure, diese umfassende Adenoviren und deren Verwendung.

Bei der Behandlung von Tumoren werden derzeit eine Vielzahl von Therapiekonzepten verfolgt. Neben der Verwendung chirurgischer Techniken stehen dabei die Chemotherapie und die Strahlentherapie im Vordergrund. All diese Techniken sind jedoch für den Patienten mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen verbunden.

Mit der Verwendung von replikationsselektiven onkolytischen Viren wurde eine neue Plattform für die Behandlung von Tumoren geschaffen. Dabei wird eine selektive intratumorale Replikation eines viralen Agens herbeigeführt, die in der Folge zur Virusreplikation, Lyse der infizierten Tumorzelle und Verbreitung des Virus auf benachbarte Tumorzellen führt. Infolge der Beschränkung der Replikationsfähigkeit des Virus auf Tumorzellen bleibt normales Gewebe von der Infektion und damit der Lyse durch den Virus verschont. Beispiele für derartige replikationsselektive onkolytische Viren sind Gen-attenuierte Adenovirus und Herpesviren (Martuza, R. et al. Science 252, 854-858 (1991); Fueyo, J et al. Oncogene 19, 2-12 (2000))

Ein Beispiel für einen derartigen Adenoviren ist dl 1520 (Onyx-015), der bereits erfolgreich in den klinischen Phasen I und II eingesetzt wurde (Khuri, F. et al. Nature Medicine 6, 879-885 (2000)). Onyx-015 ist ein Adenovirus, bei dem das E1B 55-kDa-Gen deletiert ist. Das E1B-55kDa-Genprodukt ist beteiligt an der Inhibierung von p53, dem Transport viraler mRNA und dem Abschalten der Proteinsynthese der Wirtszelle. Die Inhibierung von p53 erfolgt dabei durch Ausbilden eines Komplexes aus p53 und dem adenoviral codierten E1B-55kDa Protein. Von p53, codiert von TP53, geht ein komplexer regulatorischer Mechanismus aus (Zambetti, G.P. et al., FASEB J, 7, 855-865), der u.a. auch dazu führt, dass eine effiziente Replikation von Viren wie Adenoviren in der Zelle unterdrückt wird. Das Gen TP 53 ist in etwa 50 % aller menschlichen Tumoren deletiert oder mutiert mit der Folge, dass es zu keiner – erwünschten – Apoptose infolge einer Chemotherapie oder einer Bestrahlungstherapie kommt und damit der Erfolg dieser Tumorbehandlungen im Normalfall unterbleibt.

DNA-Tumurviren, wie Adenoviren, treiben die infizierten Zellen in die S-Phase des Zellzyklus, um die virale DNA-Replikation zu erleichtern. Onyx-015 exprimiert das E1B-55 kDa Protein nicht und repliziert selektiv in Tumorzellen gegenüber normalen Zellen. Darüberhinaus besteht eine weitere Selektivität dahingehend, dass solche Tumoren infolge der viralen Lyse der Tumorzellen eine vergleichsweise stärkere Nekrose erfahren, die p53-defizient sind, als jene, die den p53-Wildtyp aufweisen (Khuri et al., aaO). Trotz der grundsätzlichen Wirksamkeit von Onyx-015 bei der viral induzierten Onkolyse im Falle von p53-defizienten Tumoren ist die Erfolgsrate von 15 % der behandelten Tumore sehr gering.

Ries et al. (Ries, S.J. et al. Nature Medicine 6, 1128 – 1132 (2000) haben eine prinzipielle Möglichkeit aufgezeigt, wie Onyx-015 auch bei Tumoren mit p53-Wildtyp erfolgreich verwendet werden können. Dabei wird das Tumorsuppressor-Protein p14ARF nicht exprimiert. In Folge des Fehlens von p14ARF unterbleibt die normale Reaktion des p53-Systems auf eine virale Infektion und erlaubt damit die Replikation von Onyx-015 auch in diesen Tumoren. Eine Anwendung dieser Erkenntnis setzt jedoch voraus, dass in der Tumorzelle ein geeigneter genetischer Hintergrund existiert oder durch geeignete therapeutische Maßnahmen bereitgestellt wird. Im ersten Falle würde sich die Anzahl der mittels Onyx-015 therapierbaren Tumoren weiter verringern, im zweiten Fall wäre eine aufwendige Änderung des genetischen Hintergrundes der Tumorzellen erforderlich.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die bestehenden adenoviralen Systeme für die viral induzierte Onkolyse zu verbessern. Insbesondere soll dabei die Erfolgsrate, mit der Tumoren erfolgreich behandelt werden können, erhöht sein verglichen mit dem Stand der Technik.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, adenovirale Systeme für die viral induzierte Onkolyse bereitzustellen, die auch bei solchen Tumoren wirksam sind, die vom p53-Wildtyp sind.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem ersten Aspekt gelöst durch eine Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die adenovirale Nukleinsäure eine für E1-B codierende Nukleinsäure umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die adenovirale Nukleinsäure eine für E4orf6 codierende Nukleinsäure umfasst.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist ein Promotor vorgesehen, der die Expression von E1-B steuert.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass ein Promotor vorgesehen ist, der die Expression von E4orf6 steuert.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass E1B das E1-B 55 kDa-Protein ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure für funktional inaktive Genprodukte E1B und/oder E1 und/oder E3 und/oder E4 codiert.

In einem zweiten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Nukleinsäure umfassend eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz und eine einen Kerntransport von YB-1 vermittelnde Nukleinsäuresequenz.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die den Kerntransport von YB-1 vermittelnde Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, die Signalsequenzen und Transportsequenzen umfasst.

In einem dritten Aspekt betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, wobei die adenovirale Nukleinsäure anstelle eines bzw. des funktionalen late E2-Promotors, insbesondere des funktional aktiven late E2-Promotors, einen tumorspezifischen Promotor aufweist.

In einem vierten Aspekt betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, wobei die adenovirale Nukleinsäure anstelle eines bzw. des funktionalen late E2-

Promotors, insbesondere des funktional aktiven late E2-Promotors, einen gewebespezifischen Promotor aufweist.

In einem fünften Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein adenovirales Replikationssystem umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, wobei die adenovirale Nukleinsäure defizient für die Expression des E1A-Proteins ist, und umfassend eine Nukleinsäure eines Helfervirus, wobei die Nukleinsäure des Helfervirus eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für YB-1 codiert.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die adenovirale Nukleinsäure und/oder die Nukleinsäure des Helfervirus als replizierbarer Vektor vorliegt.

In einem sechsten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch einen Vektor, bevorzugterweise einen Expressionsvektor, der ein der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren umfasst.

In einem siebten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Vektorgruppe umfassend mindestens zwei Vektoren, wobei die Vektorgruppe insgesamt ein erfindungsgemäßes adenovirales Replikationssystem umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass eine jede Komponente des adenoviralen Replikationssystems auf einem eigenen Vektor, bevorzugterweise einem Expressionsvektors, angeordnet ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass mindestens zwei Komponenten des adenoviralen Replikationssystems auf einem Vektor der Vektorgruppe angeordnet sind.

In einem achten Aspekt betrifft die Erfindung ein Adenovirus umfassend eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Adenovirus ein Kapsid umfasst.

In einem neunten Aspekt betrifft die Erfindung eine Zelle umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder ein erfindungsgemäßes adenovirales Replikationssystem und/oder einen

erfindungsgemäßen Vektor und/oder eine erfindungsgemäße Vektorgruppe und/oder einen erfindungsgemäßen Adenovirus.

In einem zehnten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder eines erfindungsgemäßen adenoviralen Replikationssystems und/oder eines erfindungsgemäßen Vektors und/oder einer erfindungsgemäßen Vektorengruppe und/oder eines erfindungsgemäßen Adenovirus und/oder einer erfindungsgemäßen Zelle zur Herstellung eines Medikaments.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Medikament für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Medikament weiter eine pharmazeutisch wirksame Verbindung enthält.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die pharmazeutische Verbindung aus gewählt ist aus der Gruppe, die Zytostatika umfasst. Geeignete Zytostatika sind, unter anderem cis-Platin, Taxol, Daunoblastin, Adriamycin und Mitoxantron.

In einem elften Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder eines erfindungsgemäßen adenoviralen Replikationssystems und/oder eines erfindungsgemäßen Vektors und/oder einer erfindungsgemäßen Vektorengruppe und/oder eines erfindungsgemäßen Adenovirus und/oder einer erfindungsgemäßen Zelle zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen, wobei die Tumorzellen eine vom Zellzyklus unabhängige Kernlokalisation von YB-1 aufweisen.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure für eine adenovirale Nukleinsäure codiert und die adenovirale Nukleinsäure E1B-defizient, insbesondere E1B 55kDa-defizient ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Adenovirus E1B-defizient, insbesondere E1B 55 kDa- defizient ist.

In einer alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure für eine adenovirale Nukleinsäure codiert und die adenovirale Nukleinsäure für E1B codiert, insbesondere für E1B 55kDa.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Adenovirus E1B exprimiert, insbesondere E1B 55 kDa.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die adenovirale Nukleinsäure für E1A codiert.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Adenovirus E1A exprimiert.

In den verschiedenen Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Tumor und/oder die Tumorerkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die p53-positive Tumoren, p53-negative Tumoren, maligne Tumoren, benigne Tumoren und Kombinationen davon umfasst.

In einem zwölften Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Screenen von Patienten, die mit einem E1B-defizienten, bevorzugterweise E1B 55 kDa-defizienten, Adenovirus behandelbar sind, welches die folgenden Schritte umfasst:

- Untersuchen einer Probe des Tumorgewebes und
- Feststellen, ob YB-1 im Kern Zellzyklus-unabhängig lokalisiert ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Untersuchung des Tumorgewebes unter Verwendung eines Mittels erfolgt, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die Antikörper gegen YB-1 umfasst.

In einem dreizehnten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines Antikörpers gegen YB-1 zur Bestimmung von Patienten, insbesondere Tumorpatienten, die mit einem E1B-defizientem, bevorzugterweise E1B 55kDa-defizientem Adenovirus behandelbar sind.

In einem vierzehnten Aspekt betrifft die Erfindung einen Komplex umfassend mindestens ein YB-1-Molekül und mindestens ein E1B 55 kDa-Protein.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das YB-1-Molekül ein transgenes YB-1-Molekül ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass das YB-1 nukleär exprimiertes YB-1 ist.

Im Zusammenhang mit den hierin offenbarten Nukleinsäuren wird der Begriff auch im Sinne von Nukleinsäuresequenzen verwendet. Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ebenso wie bei den erfindungsgemäßen Adenoviren handelt es sich bevorzugterweise um rekombinante Produkte, insbesondere dann, wenn eine Veränderung gegenüber dem Wildtyp vorgenommen wurde. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung weisen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie die erfindungsgemäßen Adenoviren typischerweise eine E1-Deletion, eine E1-E3-Deletion und/oder eine E4-Deletion auf, d. h. die Nukleinsäure bzw. die entsprechenden Adenoviren sind nicht in der Lage, funktional aktive E1- und/oder E3- und/oder E4-Expressionsprodukte zu erzeugen bzw. entsprechende Produkte können von diesen nicht erzeugt werden. Typischerweise wird dies durch eine Deletion oder eine entsprechende Mutation, einschließlich einer Punktmutation, bewerkstelligt.

In einem fünfzehnten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines Komplexes umfassend mindestens ein YB-1-Molekül und mindestens ein E1A-Protein.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass ein oder mehrere der Proteine der E1A-Region transaktivierend auf die adenovirale Genexpression, aber nicht auf die Replikation eines Adenovirus aktivierend wirkt/wirken.

In einem sechzehnten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäßen Komplexes umfassend mindestens ein YB-1-Molekül und mindestens ein E1A-Protein zur Tumorbehandlung, insbesondere zur Tumorlyse.

In einem siebzehnten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines E1B-defizienten Adenovirus zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Tumoren, die YB-1 im Kern aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Kernlokalisation von YB-1 unter dem Einfluss exogener Maßnahmen erfolgt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die exogenen Maßnahmen solche Maßnahmen sind, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die Bestrahlung, Zytostatika und Hyperthermie umfasst.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die exogene Maßnahme an dem Organismus angewandt wird, für den das Medikament bestimmt ist.

Weitere Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Der Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass nach Infektion einer Zelle, typischerweise einer Tumorzelle mit Adenovirus eine Komplexbildung zwischen YB-1 und dem adenoviralen Genprodukt E1B-55 kDa und infolge dieser Komplexbildung ein Transport von YB-1 in den Kern erfolgt, was eine effektive Replikation des Virus im Zellkern in vivo erlaubt. Dabei wurde weiter festgestellt, dass auch E4orf6 an E1B-55 K bindet (Weigel, S., Dobbelstein, M. J. Virology, 74, 764-772, 2000, The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA; Keith N. Leppard, Seminars in Virology, 8, 301-307, 1998. Regulated RNA processing and RNA transport during adenovirus infection) und somit den Transport bzw. die Verteilung von E1B-55 K in den Kern vermittelt. Durch das Zusammenwirken von E1B-55 K und YB-1 bzw. E1B-55 K, YB-1 und E4orf6 erfolgt somit eine effiziente Replikation des Virus, was wiederum zur einer Lyse der Zelle, Freisetzung des Virus und Infektion und Lyse benachbarter Zellen führt, so dass im Falle der Infektion einer Tumorzelle bzw. eines Tumors letztlich eine Lyse des Tumors, d.h. eine Onkolyse, auftritt.

Eine weitere der Erfindung zugrundeliegende Erkenntnis besteht darin, dass YB-1 als Transkriptionsfaktor an den späten E2-Promotor (engl. E2 late Promotor) von Adenovirus bindet und die Replikation des Adenovirus über diesen aktiviert. Damit werden neue Adenoviren und adenovirale Systeme für die Onkolyse möglich.

Weiterhin liegt der vorliegenden Erfindung die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass die Expression des Transgens YB-1 in einem adenoviralen Vektor zur viralen Replikation führt. Dabei werden die viralen Gene E1B, E3 und E4 nicht eingeschaltet, was im wesentlichen darin begründet liegt, dass der adenovirale Vektor hinsichtlich E1 und/oder E3 deletiert ist. Diese Gene sind jedoch für eine sehr effiziente Replikation bzw. Partikelbildung notwendig (Goodrum, F. D., Ornelles, D. A. Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J. Virol.*, 73, 74474-7488 (1999); Medghalchi, S., Padmanabhan, R., Ketner, G. Early region 4 modulates adenovirus DNA replication by two genetically separable mechanisms. *Virology*, 236, 8-17 (1997). Es ist weiterhin bekannt, dass zwei Proteine (das 12S- und das 13S-Protein), die von E1A codiert werden, die Expression der anderen adenoviralen Gene steuern bzw. induzieren (Nevins, J. R. Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene products. *Cell* 26, 213-220 (1981); Boulanger, P et al. (1991); *Biochem. J.* 275, 281-299). Dabei hat sich gezeigt, dass hauptsächlich die CR3-Region des 13S-Proteins die transaktivierende Funktion ausübt (Wong HK, Ziff EB. Complementary functions of E1a conserved region 1 cooperate with conserved region 3 to activate adenovirus serotype 5 early promoters. *J Virol.* 1994, 68(8):4910-20). Adenoviren, die bestimmte Deletionen in der CR1- und/oder CR2-Region des 13S-Proteins aufweisen, können nicht replizieren, wirken aber noch transaktivierend auf die viralen Gene bzw. Promotoren (Wong HK, Ziff EB. Complementary functions of E1a conserved region 1 cooperate with conserved region 3 to activate adenovirus serotype 5 early promoters. *J Virol.* 1994, 68(8):4910-20).

Die Kombination eines derartigen Systems, d. h. eines Systems, welches die viralen Gene einschaltet, aber nicht zur viralen Replikation fähig ist, mit einer Tumor- bzw. Gewebespezifischen Expression des Transgens YB-1 würde hingegen eine sehr effektive virale Replikation bzw. Partikelbildung und damit eine Onkolyse erlauben. Als geeignete Tumor- bzw. Gewebe-spezifische Promotoren können jene verwendet werden, wie sie hierin insgesamt beschrieben wurden.

YB-1 ist ein Vertreter der Y-Box-Proteinfamilie, die an das DNA-Sequenzmotiv Y-Box bindet. Das Y-Box-Motiv stellt ein transkriptionell regulatorisches Element dar, das sich in den Promotor-oder Enhancer-Regionen einer Anzahl unterschiedlicher Gene findet, die eine Rolle bei

der Regulation der Zellproliferation spielen (Ladomery, M. et al., 1995; Bioassays 17: 9-11; Didier, D.K. et al., 1988, PNAS, 85, 7322-7326).

Adenoviren sind in der Technik bekannt. Dabei handelt es sich um dsDNA-Viren (Boulanger, P et al. (1991); Biochem. J. 275, 281-299). Die Organisation des Genoms ist in Fig. 1 dargestellt. Die vollständige Nukleotidsequenz des adenoviralen Genoms ist bekannt und beschrieben in (Chroboczek, J. et al., Virology 1992, 186, 280-285). Ein für die Verwendung von Adenoviren besonders wichtiger Teil des Genoms sind die sogenannten frühen oder early Gene und deren Genprodukte, die als E1, E2, E3 und E4 bezeichnet werden. Dabei umfasst E1 zwei Genprodukten E1A und E1B, die Onkogene darstellen. Die insgesamt drei Genprodukte der Gruppe E2 sind zusammen mit den Genprodukten E3 und E4 an der Replikation beteiligt.

Die im Stand der Technik bekannten adenoviralen Systeme zur Onkolyse wie beispielsweise Onyx-015 weisen eine Deletion für E1B – 55 kDa-Protein auf. Diese Deletion war vorgenommen worden unter der Annahme, dass ein intaktes p53-Gen einer effiziente Replikation in vivo entgegenwirkt und um eine adenovirale Replikation in vivo nur in p53-negativen/mutierten Zellen sicher zu stellen, führt jedoch verglichen mit dem Wildtyp zu einer um zwei Größenordnungen verringerten Partikelanzahl infolge gestörter Replikation. Andererseits greifen diese adenoviralen Systeme nach dem Stand der Technik auf E1A zurück, um vermittels des frühen E2-Promotors (E2 early Promotor) die in vivo Replikation zu steuern.

Die vorliegende Erfindung wendet sich von diesem Prinzip insoweit ab, als dass die hierin beschriebenen adenovirale Systeme auf den späten E2-Promotor zurückgreifen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sollen hierin die Begriffe Adenovirus und adenovirale Systeme als im wesentlichen die gleiche Bedeutung aufweisend verstanden werden. Unter Adenovirus soll dabei insbesondere das vollständige Viruspartikel verstanden werden umfassend das Kapsid und die Nukleinsäure. Der Begriff adenovirales System stellt insbesondere darauf ab, dass die Nukleinsäure gegenüber dem Wildtyp verändert ist. Bevorzugt umfassen derartige Änderungen Änderungen im Aufbau des Genoms des Adenovirus wie Deletieren und/oder Hinzufügen und/oder Mutieren von Promotoren, regulativen Sequenzen und codierende Sequenzen (wie Leserahmen). Der Begriff adenovirale Systeme wird darüber hinaus bevorzugt in dem Zusammenhang verwendet, dass es sich dabei um einen Vektor handelt.

Die adenoviralen Nukleinsäuren, auf die hierin Bezug genommen wird, sind im Stand der Technik bekannt. Es ist im Rahmen der Kenntnisse der Fachleute auf diesem Gebiet, für die Erfindung unwesentlichen adenoviralen Nukleinsäuresequenzen zu deletieren bzw. zu mutieren. Derartige Deletionen können z. B. die für E3 codierende Nukleinsäure betreffen. In bevorzugten Ausführungsformen können diese adenoviralen Nukleinsäuren noch in das virale Kapsid verpackt werden und damit infektiöse Partikel ausbilden. Gleiches gilt für die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren. Generell gilt es auch noch festzuhalten, dass die adenoviralen Systeme hinsichtlich einzelner oder mehrerer Expressionsprodukte defizient sein können. Dabei ist zu berücksichtigen, dass dies zum einen darauf beruhen kann, dass die für die das Expressionsprodukt codierende Nukleinsäure vollständig oder in dem Maße mutiert oder deletiert ist, dass im wesentlichen kein Expressionsprodukt mehr gebildet wird, oder darauf, dass regulative bzw. die Expression steuernde Elemente wie Promotoren oder Transkriptionsfaktoren fehlen, sei es auf der Ebene der Nukleinsäure (Fehlen eines Promotors; cis-wirkende Elemente) oder auf der Ebene des Translations- bzw. Transkriptionssystems (trans-wirkende Elemente). Gerade der letztere Aspekt kann dabei vom jeweiligen zellulären Hintergrund abhängen.

Bei der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, die eine adenovirale Nukleinsäure und zusätzlich eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz umfasst, handelt es sich bevorzugterweise um eine rekombinante Nukleinsäuren. Der Leserahmen für die für YB-1 codierende Nukleinsäure kann dabei unter der Kontrolle eines die Expression und/oder Translation steuernden Elementes stehen. Dabei kann es sich beispielsweise um einen adenoviralen Promotor oder einen nicht-adenoviralen Promotor handeln. Geeignete nicht-adenovirale Promotoren können ausgewählt sein aus der Gruppe, die Cytomegalovirus-Promotor, RSV-(Rous sarcoma Virus) – Promotor, adenovirus-basierender Promotor Va I und den nicht-viralen YB-1-Promotor umfasst. Weitere virale Promotoren, die im Zusammenhang mit einem jeden Aspekt der hierin offenbarten Erfindung verwendet werden können, stellen der Telomerase-Promotor, der Alpha-Fetoprotein (AFP)-Promotor, der Caecinoembryonic Antigen Promotor (CEA) (Cao, G., Kuriyama, S., Gao, J., Mitoro, A., Cui, L., Nakatani, T., Zhang, X., Kikukawa, M., Pan, X., Fukui, H., Qi, Z. Comparison of carcinoembryonic antigen promoter regions isolated from human colorectal carcinoma and normal adjacent mucosa to induce strong tumour-selective gene expression. Int. J. Cancer, 78, 242-247, 1998), der L-Plastin-Promotor (Chung, I., Schwartz, PE., Crystal, RC., Pizzorno, G., Leavitt, J., Deisseroth, AB. Use of L-plastin promoter to develop an adenoviral

system that confers transgene expression in ovarian cancer cells but not in normal mesothelial cells. *Cancer Gene Therapy*, 6, 99-106, 1999), Arginin-Vasopressin-Promotor (Coulson, JM, Staley, J., Woll, PJ. Tumour-specific arginine vasopressin promoter activation in small-cell lung cancer. *British J. Cancer*, 80, 1935-1944, 1999) und der PSA-Promotor (Hallenbeck PL, Chang, YN, Hay, C, Golightly, D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S., Chiang, YL. A novel tumour-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Human Gene Therapy*, 10, 1721-1733, 1999) dar.

Hinsichtlich des Telomerase-Promotors ist bekannt, dass dieser in humanen Zellen von einer zentralen Bedeutung ist. So wird die Telomeraseaktivität durch die transkriptionelle Kontrolle des Telomerase reverse Transkriptase-Gens (hTERT), welches die katalytische Untereinheit des Enzyms darstellt, reguliert. Die Expression der Telomerase ist in 85% von humanen Tumorzellen aktiv. Dahingegen ist sie in den meisten normalen Zellen inaktiv. Ausgenommen sind Keimzellen und embryonales Gewebe [Braunstein, I. et al. (2001). Human telomerase reverse transcription promoter regulation in normal and malignant human ovarian epithelial cells. *Cancer Research*, 61, 5529-5536; Majumdar AS et al. (2001). Tehe telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters. *Gene Therapy*, 8, 568-578]. Genaue Untersuchungen am hTERT-Promotor haben gezeigt, dass Fragmente des Promotors von 283 bp bzw. 82 bp vom Initiationscodon entfernt für eine spezifische Expression in Tumorzellen ausreichend sind (Braunstein I. et al.; Majumdar AS et al., aaO). Daher eignet sich dieser Promotor bzw. die spezifischen Fragmente, um eine spezifische Expression eines Transgens nur in Tumorzellen zu erzielen. Der Promotor soll die Expression des Transgens YB-1 und/oder ein verkürzte Form, die funktionell noch aktiv ist, nur in Tumorzellen ermöglichen. Die Expression des Transgens in einem adenoviralen Vektor führt dann zur viralen Replikation des adenoviralen Vektors und in der Folge zu einer Onkolyse. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass der Leserahmen des YB-1 im Leserahmen (engl. „in frame“) mit einem oder mehreren der Genprodukte des adenoviralen Systems ist. Der Leserahmen von YB-1 kann jedoch auch unabhängig davon sein. Bei der für YB-1 codierenden Nukleinsäure kann es sich um die vollständige Sequenz handeln. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Nukleinsäuresequenz verkürzt ist. Eine derartige verkürzte Nukleinsäuresequenz und damit auch ein derartiges verkürztes YB-1-Protein ist insbesondere auch dann noch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, wenn ein derartiges verkürztes YB-1 noch eine Funktion oder

Eigenschaft aufweist, wie das vollständige YB-1. Eine derartige Funktion oder Eigenschaft ist beispielsweise die Fähigkeit, in den Kern zu gelangen, mit oder ohne an E1B-55kDa-Protein zu binden, oder an den E2 late-Promotor zu binden.

Die adenovirale Nukleinsäure, die in der erfindungsgemäßen Nukleinsäure umfasst ist, kann dabei eine jede adenovirale Nukleinsäure sein, die zu einem Replikationsereignis für sich oder in Verbindung mit weiteren Nukleinsäuresequenzen führt. Bei den weiteren Nukleinsäuresequenzen kann es sich beispielsweise um YB-1 handeln. Dabei ist es möglich, wie hierin noch ausgeführt werden wird, dass mittels Helferviren die für die Replikation erforderlichen Sequenzen und/oder Genprodukte bereitgestellt werden. Ein Beispiel für eine derartige adenovirale Nukleinsäure stelle die Nukleinsäure von Onyx-015 dar, die eine Expression von E1A aber nicht für E1B erlaubt.

Bei der Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, die eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz umfasst, kann vorgesehen sein, dass die adenovirale Nukleinsäure eine für E1-B codierende Nukleinsäure umfasst. Dabei ist es möglich, dass die für E1-B codierende Nukleinsäure zwar vorhanden ist, jedoch das durch sie codierte E1-B nicht exprimiert wird. Dies wird beispielsweise dadurch bewerkstelligt, dass der für E1-B codierenden Nukleinsäure ein geeigneter Promotor fehlt. Dies kann beispielsweise dann der Fall sein, wenn E1A nicht exprimiert wird. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass es zu einer Expression von E1-B kommt, beispielsweise indem die für E1-B codierende Nukleinsäure unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors steht. Ein geeigneter Promotor ist beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe, die Cytomegalovirus-Promotor, RSV-(Rous sarcoma Virus) - Promotor, adenovirus-basierender Promotor Va I und den nicht-viralen YB-1-Promotor umfasst. Darüber hinaus eignen sich auch in diesem Falle die vorstehend genannten Promotoren, d. h. der Telomerase-Promotor, der Alpha-Fetoprotein (AFP)-Promotor, der Caecinoembryonic Antigen Promotor (CEA), der L-Plastin-Promotor, Arginin-Vasopressin-Promotor und der PSA-Promotor.

Wie hierin offenbart ist E1-B-55k an der Verteilung bzw. dem Transport von YB-1 in den Zellkern beteiligt. Da E4orf6 wieder rum an E1-B-55k bindet und ebenfalls für den Transport von E1-B-55 in den Kern verantwortlich ist, spielt insoweit E4orf6 auch eine bedeutende Rolle für die Verteilung bzw. den Transport von YB-1 in den Zellkern. Es ist somit auch im Rahmen

der vorliegenden Erfindung, dass die Gene der E4-Region, insbesondere E4orf6 auch unter Kontrolle eines der vorstehend genannten Promotors steht. In einer bevorzugten Ausführungsform ist dabei vorgesehen, dass der adenovirale E4-Promotor nicht mehr funktional ist. Es ist dabei besonders bevorzugt, wenn der adenovirale E4-Promotor deletiert ist.

Bei einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, die eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz umfasst, kann vorgesehen sein, dass die adenovirale Nukleinsäure eine für E1-A codierende Nukleinsäure umfasst, die adenovirale Nukleinsäure jedoch keine Expression von E1-B erlaubt und somit dem Aufbau der DNA von Onyx-015 entspricht.

Allgemein gilt hierin, das wann immer Bezug genommen wird auf E1-B dies bevorzugterweise für E1B 55 kDa-Protein gilt, sofern sich kein hierzu gegenteiliger Hinweis findet.

Sofern hierin auf codierende Nukleinsäuresequenzen Bezug genommen wird und es sich dabei um solche Nukleinsäuresequenzen handelt, die bekannt sind, ist es im Rahmen der Erfindung, dass nicht nur die identische Sequenz verwendet wird, sondern auch hiervon abgeleitete Sequenzen. Unter abgeleiteten Sequenzen sollen hierin insbesondere solche Sequenzen verstanden sein, die noch zu einem Genprodukt führen, das eine Funktion aufweist, die einer Funktion der nicht abgeleiteten Sequenz entspricht. Dies kann durch einfache Routinetests festgestellt werden. Ein Beispiel für derartige abgeleitete Nukleinsäuresequenzen sind jene Nukleinsäuresequenzen, die für das gleiche Genprodukt, insbesondere für die gleiche Aminosäuresequenz codieren, jedoch infolge der Degeneriertheit des genetischen Codes eine andere Basenabfolge aufweisen.

Ein weiterer Aspekt bestehend in der erfindungsgemäßen Nukleinsäure umfassend eine für YB-1 codierende Nukleinsäure und eine einen Kerntransport von YB-1 vermittelnde Nukleinsäuresequenz beruht auf der ebenfalls überraschenden Erkenntnis, dass bei Vorhandensein von YB-1 im Kern, insbesondere unabhängig vom Zellzyklus, eine Replikation von Adenoviren in einer Zelle, bevorzugterweise in einer Tumorzelle erfolgt. Als Adenoviren bzw. adenovirale Systeme und damit die entsprechenden Nukleinsäuren können im Zusammenhang damit und in Kombination mit diesen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Adenoviren und adenoviralen Systemesowie die im Stand der Technik bekannten Adenoviren wie beispielsweise Onyx-015 verwendet werden.

Geeignete den Kerntransport vermittelnde Nukleinsäuresequenzen sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und beispielsweise beschrieben in (Whittaker, G.R. et al., Virology, 246, 1-23, 1998; Friedberg, E.C., TIBS 17, 347, 1992; Jans, D.A. et al., Bioessays 2000 Jun; 22(6): 532-44; Yoneda, Y., J. Biochem. (Tokyo) 1997 May; 121(5): 811-7; Bouliskas, T., Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 1993; 3(3): 193-227). Bei den den Kerntransport vermittelnden Nukleinsäuresequenzen können verschiedene Prinzipien verwendet werden. Ein derartiges Prinzip besteht darin, dass, dass YB-1 als Fusionsprotein mit einem Signalpeptid ausgebildet wird und infolge des Signalpeptids YB-1 in den Zellkern geschleust wird. Ein weiteres Prinzip besteht darin, dass YB-1 mit einer Transportsequenz versehen wird, die dazu führt, dass YB-1, bevorzugterweise ausgehend von einer Synthese im Cytoplasma, in den Zellkern geschleust wird und dort die virale Replikation befördert. Ein Beispiel für eine besonders wirksame den Kerntransport vermittelnde Nukleinsäuresequenz stellt die TAT-Sequenz von HIV dar, die neben weiteren geeigneten derartigen Nukleinsäuresequenzen beispielsweise beschrieben ist in Efthymiadis, A., Briggs, LJ, Jans, DA. The HIV-1 tat nuclear localisation sequence confers novel nuclear import properties. JBC, 273, 1623.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung bestehend in einer Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, wobei die adenovirale Nukleinsäure anstelle des späten (late) E2-Promotors einen tumorspezifischen Promotor aufweist, beruht ebenfalls auf der überraschenden Erkenntnis, dass die Expression und somit die Replikation des Adenovirus und damit die Onkolyse wesentlich von der Steuerung der adenoviralen Gene und Genprodukte, insbesondere der E2-Region durch den späten E2-Promotor, insbesondere in vivo, abhängt. Die eine Transkriptionseinheit darstellende E2-Region von Adenovirus besteht aus den E2A- und E2B-Genen, die für die virale Replikation vitale Proteine codieren: pTP (precursor terminal protein), die DNA-Polymerase und DBP, ein multifunktionelles DNA-Bindungs-Protein. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bezeichnen die Begrifflichkeiten deletierter Promotor, nicht-funktional aktiver, funktional nicht aktiver oder nicht-funktionaler Promotor, dass der Promotor als solcher nicht mehr aktiv ist, d. h. von diesem aus keine Transkription mehr erfolgt. Ein derartiger nicht-funktionaler Promotor kann auf den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannten Wegen erzeugt werden. Beispielsweise kann dies erfolgen durch eine vollständige Deletion des Promotors, durch eine teilweise Deletion des Promotors oder aber auch durch eine Punktmutation. Weitere Möglichkeiten der Mutationen

derartiger Promotoren können darin bestehen, dass die räumliche Beziehung der den Promotor aufbauenden Elemente verändert und dieser dadurch funktional inaktiv wird.

Mit der Inaktivierung des späten E2-Promotors und dessen Ersatz durch einen tumorspezifischen bzw. gewebespezifischen Promotor und damit dem Herstellen einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren wird gewährleistet, dass die für die adenovirale Replikation wichtigen Gene bzw. Genprodukte unter der Kontrolle des Tumors bzw. des entsprechenden Gewebes stehen mit der Folge, dass die Replikation des Adenovirus spezifisch im Tumor oder in einem bestimmten Gewebe erfolgt. Damit wird der Forderung nach spezifischer viral vermittelter Lyse von Zellen entsprochen und damit die Sicherheit des Systems gewährleistet. Die Inaktivierung des späten E2-Promotors kann dabei dadurch erfolgen, dass dieser vollständig deletiert ist. Es ist jedoch auch im Rahmen der Erfindung, dass der späte E2-Promotor so verändert ist, dass er nicht mehr als Promotor funktionell aktiv ist. Dies kann beispielsweise dadurch bewerkstelligt werden, dass die Bindungsstelle des Promotors für YB-1 so verändert, beispielsweise mutiert oder deletiert, wird, dass eine Bindung von YB-1 an den Promotor nicht mehr möglich wird. Eine entsprechende Deletion könnte die Deletion der Y-Box aus dem Promotor darstellen. Der hierin verwendete Begriff, dass eine erfindungsgemäße Nukleinsäure anstelle des E2-Promotors einen gewebe- oder tumorspezifischen Promotor aufweist, umfasst die vorstehend beschriebenen Möglichkeiten. In-so weit ist der Begriff funktional zu verstehen.

Um die Sicherheit des Systems, welches die Expression der E2-Genprodukte über einen Tumor- bzw. Gewebe-spezifischen Promotor steuert, nochmals zu verbessern, soll in einer bevorzugten Ausführungsform gleichzeitig zum E2 late Promotor der E2 early Promotor funktional inaktiv sein, beispielsweise deletiert bzw. so verändert werden, dass er nicht mehr als Promotor funktional aktiv ist. Damit wird sichergestellt, dass der E2 early Promotor keinen Einfluss auf die Expression der E2-Gene ausüben kann. Stattdessen werden erfindungsgemäß die beiden Promotoren, d. h. der E2 late Promotor sowie der E2 early Promotor bevorzugter Weise durch einen Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotor ersetzt. Auch hier können die hierin im Zusammenhang mit der YB-1 kodierenden Nukleinsäuresequenz beschriebenen Promotoren verwendet werden.

Die adenovirale Nukleinsäure bzw. die entsprechenden Adenoviren umfassen bevorzugterweise die Gene für E1A, E1B, E2 und E3. In bevorzugten Ausführungsformen kann die für E3 codierende Nukleinsäure deletiert sein.

Die vorstehend beschriebenen Konstrukte von Adenoviren und insbesondere deren Nukleinsäuren können auch in eine Zelle, insbesondere eine Tumorzelle, in Teilen eingebracht werden, wobei dann infolge der Anwesenheit der verschiedenen Einzelkomponenten diese so zusammenwirken, als stammten die Einzelkomponenten von einer einzelnen Nukleinsäure. Eine typische Ausprägung dieses hierin als adenovirales Replikationssystem bezeichneten sieht dabei vor, dass die adenovirale Nukleinsäure defizient für die Expression des E1A-Proteins ist. Das bevorzugterweise zelluläre Replikationssystem umfasst eine Nukleinsäure eines Helfervirus, wobei die Nukleinsäure des Helfervirus eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für YB-1 codiert. Dabei kann vorgesehen sein, dass die adenovirale Nukleinsäure oder die Nukleinsäure des Helfervirus einzeln oder getrennt als replizierbare Vektoren vorliegen.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können als Vektoren vorliegen. Bevorzugterweise handelt es sich um virale Vektoren. Im Falle der adenovirale Nukleinsäuren umfassenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ist das Viruspartikel dabei der Vektor. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in einem Plasmidvektor vorliegen. In einem jeden Fall weist der Vektor Elemente auf, die für die Vermehrung der inserierten Nukleinsäure (Replikation) und ggf. Expression der inserierten Nukleinsäure sorgen bzw. diese steuern. Geeignete Vektoren, insbesondere auch Expressionsvektoren, und Elemente sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und beispielsweise beschrieben in Grunhaus, A., Horwitz, M.S., 1994, Adenoviruses as cloning vectors. In Rice, C., Hrsg., Seminars in virology, London: Saunders Scientific Publications, 1992; 237 - 252.

Die oben beschriebene Ausführungsform, dass die verschiedenen Elemente der erfindungsgemäßen Nukleinsäure nicht notwendigerweise auf nur einem Vektor enthalten sein müssen, trägt der Aspekt der Erfindung Rechnung, der die Vektorgruppe umfasst. Eine Vektorgruppe umfasst entsprechend mindestens zwei Vektoren. Ansonsten gilt betreffend die Vektoren das hierin allgemein zu Vektoren ausgeführte.

Die erfindungsgemäßen Adenoviren sind durch die verschiedenen hierin offenbarten Nukleinsäuren charakterisiert und umfassen ansonsten all jene den Fachleuten auf dem Gebiet bekannten Elemente, wie dies auch bei Adenoviren vom Wildtyp der Fall ist (Shenk, T.:

Adenoviridae: The virus and their replication. Fields Virology, 3. Auflage, Hrsg. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, Kapitel 67).

Die erfindungsgemäßen Agenzien, d.h. die Nukleinsäuren, diese enthaltende Vektoren und Vektorengruppen, Zellen und Adenoviren und adenoviralen Replikationssysteme können für die Herstellung eines Medikamentes verwendet werden. Infolge der spezifischen Aktivitäten der erfindungsgemäßen Agenzien wird das Medikament bevorzugt ein solches für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen sein. Grundsätzlich eignen sich diese Agenzien für alle Tumorerkrankungen bzw. Tumoren, insbesondere auch solche Tumoren, die p53 enthalten, und solche, denen p53 fehlt. Unter dem Begriff Tumor sollen sowohl maligne wie benigne Tumoren verstanden werden.

Das Medikament kann dabei in verschiedenen Formulierungen vorliegen, bevorzugterweise in einer flüssigen Form. Weiterhin wird das Medikament Hilfsstoffe wie Stabilisatoren, Puffer, Konservierungsstoffe und dergleichen enthalten, die dem Fachmann auf dem Gebiet der Galenik bekannt sind.

Das Medikament kann dabei insbesondere auch weitere pharmazeutisch aktive Verbindungen enthalten. Die Art und der Umfang dieser weiteren pharmazeutisch aktiven Verbindungen wird dabei von der Art der Indikation abhängen, für die das Medikament eingesetzt wird. Im Falle der Verwendung des Medikamentes für die Behandlung und/oder die Prophylaxe von Tumorerkrankungen werden typischerweise Zytostatika, wie beispielsweise cis-Platin und Taxol, Daunoblastin, Adriamycin und/oder Mitoxantron verwendet.

Die Verwendung von attenuierten Adenoviren wie Onxy-015, der hinsichtlich des E1B-55 kDa-Proteins defizient ist, ist bei der Verwendung zur viralen Onkolyse mit vergleichsweise geringen Erfolgsaussichten verbunden. Der vorliegende Erfinder hat überraschenderweise festgestellt, dass diese attenuierten Viren, insbesondere auch Onyx-015 mit besonders großer Erfolgsrate bei solchen Tumoren verwendet werden kann, wo YB-1 unabhängig vom Zellzyklus im Zellkern vorkommt. Normalerweise ist YB-1 im Cytoplasma, insbesondere auch im perinukleärem Plasma vorhanden. In der S-Phase des Zellzyklus findet sich YB-1 im Zellkern von sowohl normalen wie auch Tumorzellen. Dies ist jedoch nicht ausreichend, um eine virale Onkolyse unter Verwendung der von attenuierten Adenoviren zu bewerkstelligen. Die im Stand der

Technik beschriebene vergleichsweise geringe Wirksamkeit von attenuierten Adenoviren wie Onyx-015 beruht auch auf deren fehlerhaften Anwendung. Mit anderen Worten, es können derartige Systeme, insbesondere auch Onyx-015 mit einer größeren Wirksamkeit dort eingesetzt werden, wo die molekularbiologischen Voraussetzungen für eine virale Onkolyse gegeben sind. Im Falle von insbesondere Onyx-015 liegen diese Voraussetzungen vor bei solchen Tumorerkrankungen, deren Zellen eine vom Zellzyklus unabhängige Kernlokalisierung von YB-1 aufweist. Diese Form der Kernlokalisierung kann dabei durch die Art des Tumors selbst bedingt sein, oder aber durch die hierin beschriebenen erfindungsgemäßen Agenzien bewirkt werden. Die vorliegende Erfindung definiert somit eine neue Gruppe von Tumoren bzw. Tumorerkrankungen und damit auch von Patienten, die mit den erfindungsgemäßen Agenzien, besonders aber auch mit dem im Stand der Technik bereits beschriebenen attenuierten Adenovirus, bevorzugt mit E1B-defizienten, bevorzugterweise E1B 55 kDa-defizienten, Adenovirus und bevorzugterweise mit Onyx-015 mit großer Erfolgsrate behandelt werden können.

Eine weitere Gruppe von Patienten, die unter Verwendung der im Stand der Technik beschriebenen Adenoviren, insbesondere solche, die E1B-defizient sind, wie beispielsweise ONYX-015, therapiert werden können, sind jene, bei denen durch Anlegen bestimmter Bedingungen gewährleistet wird, dass YB-1 in den Kern wandert oder transportiert wird. Die Verwendung derartiger Adenoviren bei dieser Patientengruppe beruht insoweit auf der Erkenntnis, dass die Induktion der viralen Replikation auf der Kernlokalisierung von YB-1 mit anschließender Bindung an den E2-late-Promotor beruht. Infolge der hierin offenbarten Erkenntnisse ist das Adenovirus ONYX-015, welches E1B-defizient ist, nicht in der Lage, den Kerntransport des zellulären YB-1 zu vermitteln. Dies begründet die beschränkte Verwendung und Erfolg von ONYX-015 auf solche Tumoren, die YB-1 bereits im Kern aufweisen. Dies ist jedoch nur bei einer sehr geringen Patientengruppe gegeben. Durch Kernlokalisierung von YB-1 kann durch Stress von außen bzw. lokal applizierten Stress induziert werden. Diese Induzierung kann beispielsweise durch Bestrahlung, insbesondere UV-Bestrahlung, Anwendung von Zytostatika, wie sie unter anderem hierin ebenfalls offenbart sind, und Hyperthermie erfolgen. Im Zusammenhang mit der Hyperthermie ist beachtlich, dass diese zwischenzeitlich sehr spezifisch realisiert werden kann und somit ebenfalls spezifisch ein Kerntransport von YB-1 in den Zellkern erfolgt und infolgedessen die Voraussetzungen für eine Replikation des Adenovirus und damit einer Zell- und Tumorlyse gegeben sind (Stein U, Jurchott K, Walther W, Bergmann

S, Schlag PM, Royer HD. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. J Biol Chem. 2001;276(30):28562-9; Hu Z, Jin S, Scotto KW. Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. J Biol Chem. 2000 Jan 28;275(4):2979-85; Ohga T, Uchiumi T, Makino Y, Koike K, Wada M, Kuwano M, Kohno K. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. J Biol Chem. 1998, 273(11):5997-6000).

Das erfindungsgemäße Medikament würde somit an solche Patienten und Patientengruppen verabreicht werden bzw. wäre für solche bestimmt, bei denen durch geeignete Vorbehandlungen ein Transport von YB-1, insbesondere in die entsprechenden Tumorzellen, bedingt werden würde.

Damit betrifft die Erfindung in einem weiteren Aspekt auch ein Verfahren zum Screenen von Patienten, die mit einem attenuierten Adenovirus, wie Onyx-1 oder allgemeiner mit E1B-defizienten, bevorzugterweise E1B 55 kDa-defizienten, Adenovirus behandelbar sind, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Untersuchen einer Probe des Tumorgewebes und
- Feststellen, ob YB-1 im Kern Zellzyklus-unabhängig lokalisiert ist.

Die Probe des Tumorgewebes kann dabei durch Punktion oder durch einen chirurgischen Eingriff erhalten werden. Die Feststellung, ob im Kern YB-1 Zellzyklus-unabhängig lokalisiert ist, wird dabei häufig unter Verwendung mikroskopischer Techniken und/oder mittels Immunhistoanalyse, typischerweise unter Verwendung von Antikörpern, erfolgen. Die Detektion von YB-1 erfolgt dabei unter Verwendung eines Mittels, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die Antikörper gegen YB-1, umfasst. Der Nachweis darüber, dass YB-1 im Kern und insbesondere dort Zellzyklus-unabhängig lokalisiert wird, ist dem Fachmann bekannt. Beispielsweise kann bei dem Durchmustern von gegen YB-1 gefärbten Gewebeschnitten die Lokalisation von YB-1 leicht erkannt werden. Dabei ergibt sich bereits infolge der Häufigkeit des Auftretens von YB-1 im Kern, dass es sich um eine Zellzyklus-unabhängige Lokalisation im Kern handelt. Eine weitere Möglichkeit zum zellzyklusunabhängigen Nachweise von YB-1 im Kern besteht in der Durchführung einer Färbung gegen YB-1 und Feststellen, ob YB-1 im Kern lokalisiert ist, und

Durchführung der Bestimmung des Zellstadiums der Zellen. Auch dies kann mittels geeigneter Antikörper erfolgen (Doppelimmunohistoanalyse).

Die Erfindung wird im folgenden an Hand der Figuren und Beispiel weiter erläutert, aus denen sich weitere Merkmale, Ausführungsformen, Anwendungen und Vorteile ergeben. Dabei zeigt

- Fig. 1 die grundsätzliche molekulargenetische Organisation des Adenovirus;
- Fig. 2 eine Übersicht verschiedener erfindungsgemäßer Nukleinsäure- bzw. Adenoviruskonstrukte; und
- Fig. 3 das Ergebnis einer Northern Blot-Analyse.

In Fig. 2 sind verschiedene der erfindungsgemäßen Nukleinsäure bzw. Nukleinsäurekonstrukte dargestellt. So zeigt Fig. 2.1A einen erfindungsgemäßen rekombinanten adenoviralen Vektor, der E1A-defizient und E1B-defizient ist, aber das Protein YB-1 exprimiert.

Fig. 2.1B zeigt einen erfindungsgemäßen rekombinanten adenoviralen Vektor, der ebenfalls YB-1 exprimiert, bei dem jedoch die E1A-Region deletiert ist. Da E1A für die Expression für E1B verantwortlich ist, kommt es zu keiner bzw. einer verringerten Aktivierung von E1B, obwohl der Vektor das Gen aufweist.

Fig. 2.2 zeigt einen erfindungsgemäßen rekombinanten adenoviralen Vektor, der ebenfalls YB-1 exprimiert. Hier wird das Gen E1B bzw. E1B-55kDa über einen externen E1A-unabhängigen Promotor gesteuert. Ein derartiger Promotor kann der CMV -, RSV- oder der YB-1-Promotor sein.

Fig. 2.3 zeigt einen weiteren erfindungsgemäßen rekombinanten adenoviralen Vektor, der einen YB-1- unabhängigen E2 late-Promotor aufweist. Dies wird dadurch erreicht, dass der vollständige E2 late-Promotor entfernt wird oder eine gezielte Veränderung der Gensequenz innerhalb des Promotors vorgenommen wird, an welche YB-1 bindet (die sogenannte Y-Box)

Fig. 2.4 zeigt einen weiteren erfindungsgemäßen rekombinanten adenoviralen Vektor, bei dem sowohl der E2 late als auch der E2 early -Promotor deletiert und somit nicht mehr funktional aktiv ist. In dem schematisch dargestellten Vektor sind die beiden Promotoren durch einen Tumor- oder Gewebe-spezifischen Promotor, wie er hierin offenbart ist, ersetzt.

Beispiel 1: Bedeutung von YB-1 für die adenovirale Replikation

Um den Nachweis zu erbringen, dass YB-1 die Expression von E2 über den E2 late-Promotor steuert, wurde der folgende experimentelle Ansatz gewählt.

Tumorzellen (HeLa-Zellen) wurden entweder mit Wildtyp-Adenovirus, einem E1-minus Adenovirus oder mit einem E1-minus Adenovirus, welches YB-1 exprimiert (AdYB-1) infiziert (K steht dabei für Kontrolle; nicht infiziert). Nach 24 h wurde die gesamte RNA isoliert. Anschließend wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Die isolierte RNA wurde dann gelelektrophoretisch in einem Formaldehyd-Agarose-Gel nach der Größe aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet und unter UV fixiert. Als radioaktiv markierte Sonde wurde ein cDNA-Fragment von 250 Basen, das komplementär ist zu einer Sequenz verwendet, die zwischen dem E2 early Promotor und dem E2 late Promotor liegt. Die Markierung der Sonde erfolgte mit Hilfe des Random Prime Labeling Systems der Firma Amersham. Die Auswertung der Filme ergab, dass nur bei mit Wildtyp-Adenovirus infizierten Zellen ein E2-spezifisches Signal vorhanden ist.

Beispiel 2: Bedeutung von YB-1 für die adenovirale Replikation

Um den Nachweis zu erbringen, dass YB-1 die Expression von E2 über den E2 late-Promotor steuert, wurde der folgende weitere experimentelle Ansatz gewählt, der auf dem in Beispiel 1 beschriebenen Ansatz aufbaut.

Die radioaktive Sonde nach Beispiel 1 wird durch Kochen für 2 Minuten in Wasser entfernt und nochmals mit einer anderen cDNA-Sonde hybridisiert. Diese Sonde liegt stromaufwärts des E2 late-Promotors.

Die Auswertung ergab das folgende Ergebnis: Sowohl die Wildtyp-Adenovirus infizierten Zellen wie auch die mit AdYB-1 infizierten Zellen weisen ein deutliches Signal bzw. eine spezifische E2-Bande auf. Daraus ergibt sich, dass YB-1 die E2-Region über den E2 late-Promotor steuert bzw. aktiviert.

Beispiel 3: Nachweis der spezifischen Bindung von YB-1 an den E2-Promotor

Dem Experiment liegt die Überlegung zugrunde, das YB-1 als Transkriptionsfaktor an die Y-Box (CAAT-Sequenz) innerhalb des E2 late-Promotors binden sollte. Um eine solche spezifische Bindung von YB-1 an diesen Promotor nachzuweisen, wird eine sogenannte EMSA-Analyse (electrophoretic mobility shift assay) durchgeführt. Dabei werden 24 h nach Infektion der Zellen mit Wildtyp-Adenovirus die Kernproteine isoliert. Anschließend werden 1 – 10 µg Protein und ein kurzes DNA-Fragment mit einer Länge von 30 bis 80 Basen, das die E2 late-Promotorsequenz aufweist, zusammen bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Dieses DNA-Fragment (Oligo) wird zuvor mit einer Kinase am 5'-Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert. Anschließend erfolgt die Auftrennung in einem nativen Polyacrylamidgel. Falls das Protein YB-1 an einer Sequenz am Oligo bindet, kommt es zu einem sogenannten shift (Verschiebung), da durch die Bindung von YB-1 an das kurze DNA-Fragment, das am 5'-Ende radioaktiv markiert ist, im Gel langsamer wandert als ein ungebundenes Oligo. Dieser shift kann wieder aufgehoben werden, sobald man einen hundertfachen Überschuss an nicht markiertem Oligo zum Reaktionsansatz zugibt.

Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass YB-1 spezifisch an den E2-late-Promotor bindet.

Als Kontrolle wurde Kompetitionsexperimente durchgeführt. Dabei wird ein Überschuss vom nicht-markiertem E2-late-Promotor-Fragment zum Reaktionsansatz zugegeben. Daraufhin ist in dem obigen Reaktionsansatz ein shift nicht mehr festzustellen.

Soweit in der vorstehenden Beschreibung Bezug genommen wird auf den Stand der Technik, wird dieser bzw. dessen Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme herein aufgenommen.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz umfasst.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die adenovirale Nukleinsäure eine für E1-B codierende Nukleinsäure umfasst.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die adenovirale Nukleinsäure eine für E4orf6 codierende Nukleinsäure umfasst.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Promotor vorgesehen ist, der die Expression von E1-B steuert.
5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass ein Promotor vorgesehen ist, der die Expression von E4orf6 steuert.
6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass E1B das E1-B 55 kDa-Protein ist.
7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure für funktional inaktive Genprodukte E1B und/oder E1 und/oder E3 und/oder E4 codiert.
8. Nukleinsäure umfassend eine für YB-1 codierende Nukleinsäure und eine einen Kerntransport von YB-1 vermittelnde Nukleinsäuresequenz.
9. Nukleinsäure nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die den Kerntransport von YB-1 vermittelnde Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, die Signalsequenzen und Transportsequenzen umfasst.

10. Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass die adenovirale Nukleinsäure anstelle eines funktionalen late E2-Promotors (später E2-Promotors) einen tumorspezifischen Promotor aufweist.
11. Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass die adenovirale Nukleinsäure anstelle eines funktionalen late E2-Promotors (später E2-Promotors) einen gewebespezifischen Promotor aufweist.
12. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die adenovirale Nukleinsäure einen nicht-funktionalen early E2-Promotor (früher E2-Promotor) umfasst.
13. Adenovirales Replikationssystem umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, wobei die adenovirale Nukleinsäure defizient für die Expression des E1A-Proteins ist, und umfassend eine Nukleinsäure eines Helfervirus, wobei die Nukleinsäure des Helfervirus eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für YB-1 codiert.
14. Adenovirales Replikationssystem nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die adenovirale Nukleinsäure und/oder die Nukleinsäure des Helfervirus als replizierbarer Vektor vorliegt.
15. Vektor, bevorzugterweise ein Expressionsvektor, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
16. Vektorgruppe umfassend mindestens zwei Vektoren, wobei die Vektorgruppe insgesamt ein adenovirales Replikationssystem nach Anspruch 13 oder 14 umfasst.
17. Vektorgruppe nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass eine jede Komponente des adenoviralen Replikationssystems auf einem eigenen Vektor, bevorzugterweise einem Expressionsvektor, angeordnet ist.

18. Vektorgruppe nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Komponenten des adenoviralen Replikationssystems auf einem Vektor der Vektorgruppe angeordnet sind.
19. Adenovirus umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
20. Adenovirus nach Anspruch 19 umfassend ein Kapsid.
21. Zelle umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und/oder ein adenovirales Replikationssystem nach Anspruch 13 oder 14 und/oder einen Vektor nach Anspruch 15 und/oder eine Vektorgruppe nach einem der Ansprüche 16 bis 18 und/oder einen Adenovirus nach Anspruch 19 oder 20.
22. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder eines adenoviralen Replikationssystems nach Anspruch 13 oder 14 und/oder eines Vektors nach Anspruch 15 und/oder einer Vektorengruppe nach einem der Ansprüche 16 bis 18 und/oder eines Adenovirus nach Anspruch 19 oder 20 und/oder einer Zelle nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Medikaments.
23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen ist.
24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament weiter eine pharmazeutisch wirksame Verbindung enthält.
25. Verwendung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Verbindung aus gewählt ist aus der Gruppe, die Zytostatika umfasst, die bevorzugterweise ausgewählt sind aus der Gruppe, die cis-Platin, Taxol, Daunoblastin, Adriamycin und Mitoxantron umfasst.
26. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder eines adenoviralen Replikationssystems nach Anspruch 13 oder 14 und/oder eines Vektors nach Anspruch 12 und/oder einer Vektorengruppe nach einem der Ansprüche 16 bis 18 und/oder eines

Adenovirus nach Anspruch 19 oder 20 und/oder einer Zelle nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen, wobei die Tumorzellen eine vom Zellzyklus unabhängige Kernlokalisation von YB-1 aufweisen.

27. Verwendung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure für eine adenovirale Nukleinsäure codiert und die adenovirale Nukleinsäure E1B-defizient, insbesondere E1B 55kDa-defizient ist.

28. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Adenovirus E1B-defizient, insbesondere E1B 55 kDa- defizient ist.

29. Verwendung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure für eine adenovirale Nukleinsäure codiert und die adenovirale Nukleinsäure für E1B codiert, insbesondere für E1B 55kDa.

30. Verwendung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass der Adenovirus E1B exprimiert, insbesondere E1B 55 kDa.

31. Verwendung nach Anspruch 26, 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass die adenovirale Nukleinsäure für E1A codiert.

32. Verwendung nach einem der Ansprüche 26, 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass der Adenovirus E1A exprimiert.

33. Verwendung nach einem der Ansprüche 26 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor und/oder die Tumorerkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die p53-positive Tumoren, p53-negative Tumoren, maligne Tumoren, benigne Tumoren und Kombinationen davon umfasst.

34. Verfahren zum Screenen von Patienten, die mit einem E1B-defizienten, bevorzugterweise E1B 55 kDa-defizienten, Adenovirus behandelbar sind, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- Untersuchen einer Probe des Tumorgewebes und

- Feststellen, ob YB-1 im Kern Zellzyklus-unabhängig lokalisiert ist.

35. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung des Tumorgewebes unter Verwendung eines Mittels erfolgt, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die Antikörper gegen YB-1 umfasst.
36. Verwendung eines Antikörpers gegen YB-1 zur Bestimmung von Patienten, insbesondere Tumorpatienten, die mit einem E1B-defizientem, bevorzugterweise E1B 55kDa-defizientem Adenovirus behandelbar sind.
37. Komplex umfassend mindestens ein YB-1-Molekül und mindestens ein E1B 55 kDa-Protein.
38. Komplex nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass das YB-1-Molekül ein transgenes YB-1-Molekül ist.
39. Komplex umfassend mindestens ein YB-1-Molekül und mindestens ein E1A-Protein.
40. Komplex nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere der Proteine der E1A-Region transaktivierend auf die adenovirale Genexpression, aber nicht auf die Replikation eines Adenovirus aktivierend wirkt/wirken.
41. Verwendung eines Komplexes nach Anspruch 39 zur Tumorbehandlung, insbesondere zur Tumorlyse.
42. Komplex nach Anspruch 37 oder 38, dadurch gekennzeichnet, dass das YB-1 nukleär exprimiertes YB-1 ist.
43. Verwendung eines E1B-defizienten Adenovirus zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren, die YB-1 im Kern aufweisen.
44. Verwendung nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Kernlokalisation von YB-1 unter dem Einfluss exogener Maßnahmen erfolgt.

45. Verwendung nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass die exogenen Maßnahmen solche Maßnahmen sind, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die Bestrahlung, Zytostatika und Hyperthermie umfasst.
46. Verwendung nach Anspruch 44 oder 45, dadurch gekennzeichnet, dass die exogene Maßnahme an dem Organismus angewandt wird, für den das Medikament bestimmt ist.

1/3

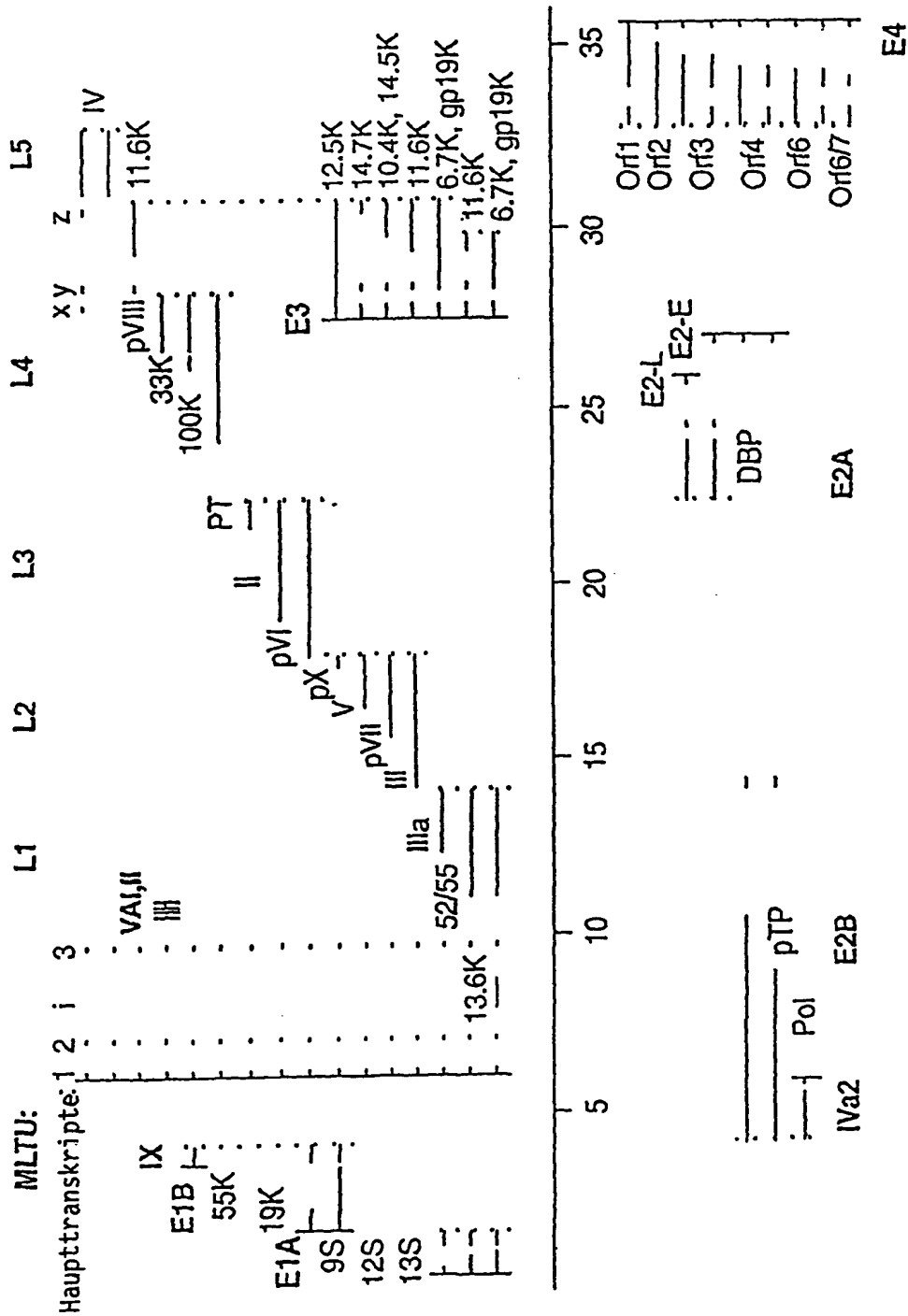
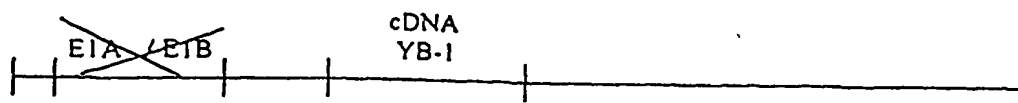


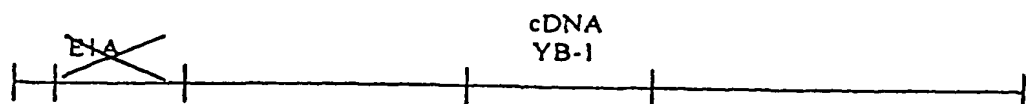
Fig. 1

2/3

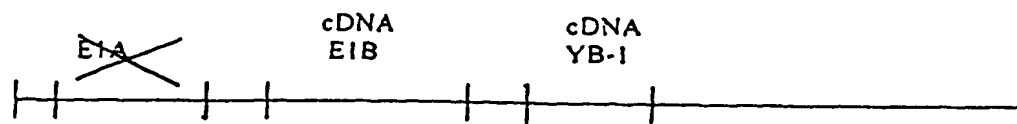
2.1A.



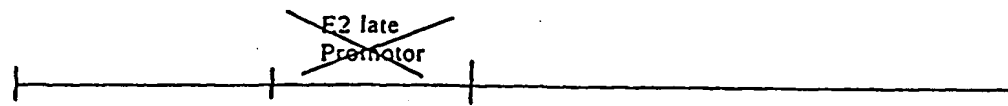
2.1B.



2.2.



2.3.



2.4

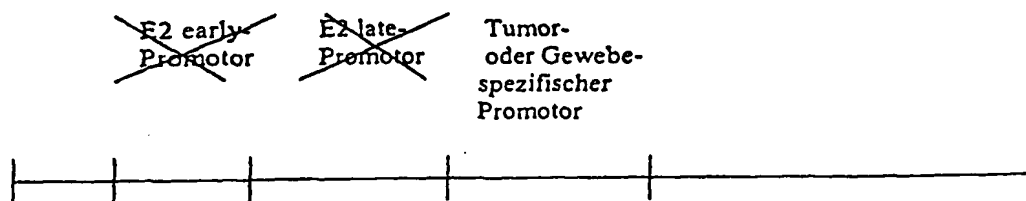


Fig. 2

3/3

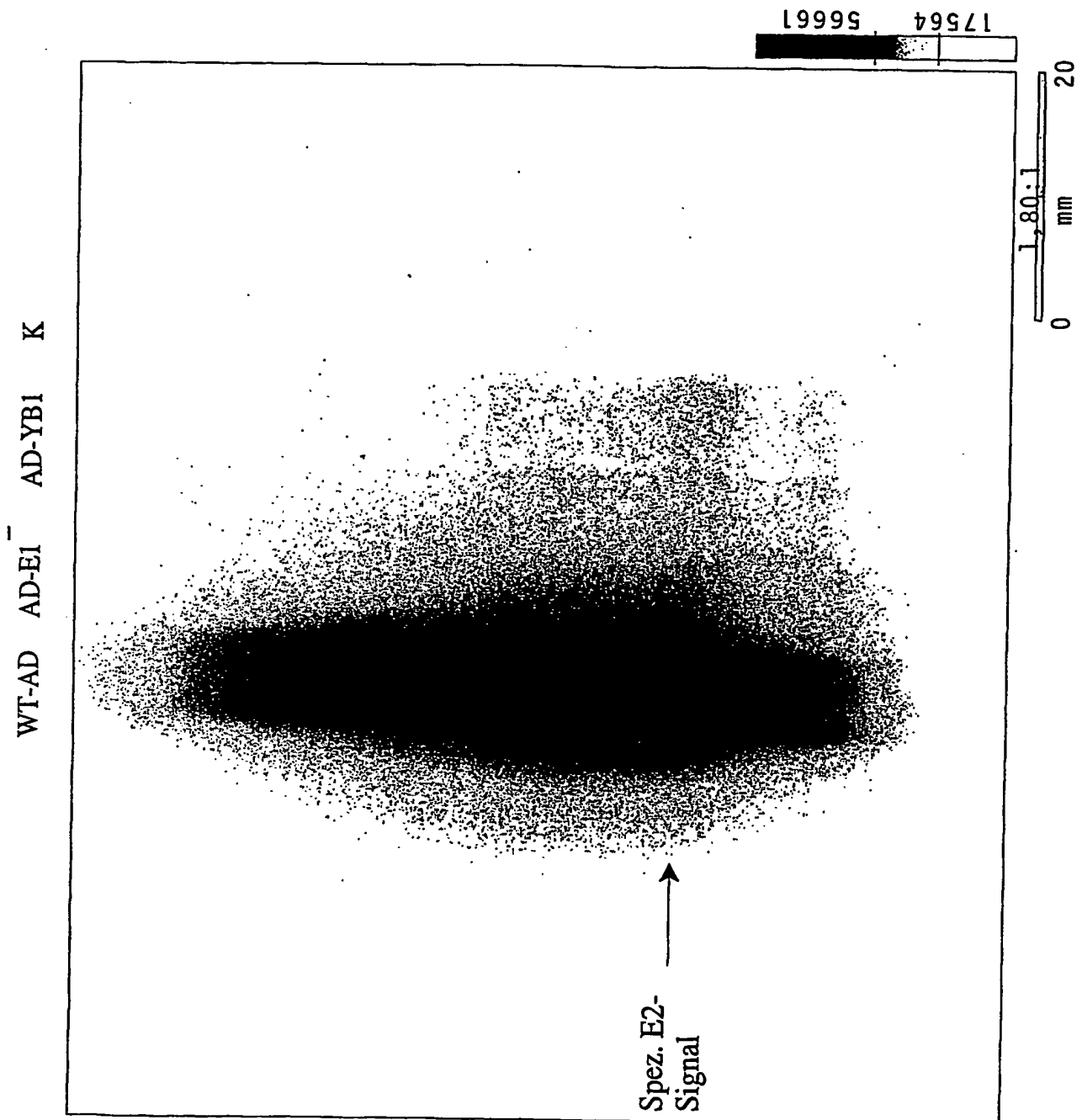


Fig. 3

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Juli 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/053711 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/861,
5/10, C07K 14/47, 14/075, A61K 48/00, 38/17, G01N
33/53

101 50 945.6 16. Oktober 2001 (16.10.2001) DE

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15212

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: HOLM, Per, Sonne [DK/DE]; Meisenstr. 27,
82256, Fürstenfeldbruck (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Dezember 2001 (21.12.2001)

(74) Anwalt: BOHMANN, Armin, K.; Bohmann & Loosen,
Sonnenstr. 8, 80331 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

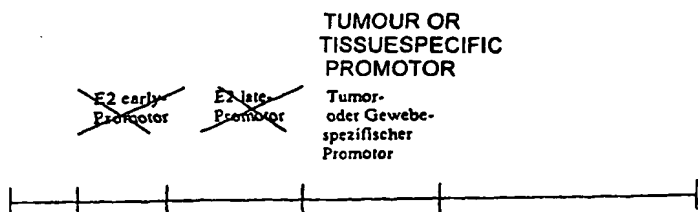
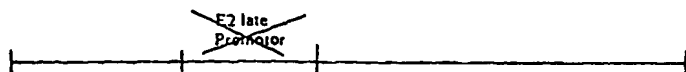
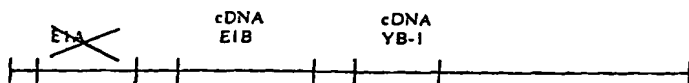
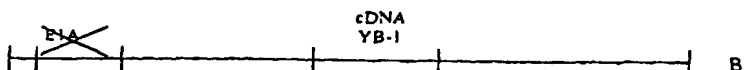
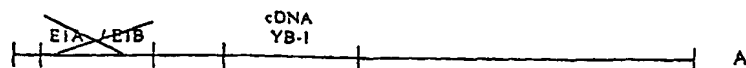
(30) Angaben zur Priorität:
100 65 504.1 28. Dezember 2000 (28.12.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: USE OF TRANSCRIPTION FACTOR YB-1 IN ADENOVIRAL SYSTEMS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS YB-1 IN ADENOVIRALEN SYSTEMEN



(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid comprising an adenoviral nucleic acid, which also contains a nucleic acid sequence coding for YB-1.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure umfassend eine adenovirale Nukleinsäure, die zusätzlich eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz umfasst.

WO 02/053711 A3



SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

23. Januar 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/15212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/861 C12N5/10 C07K14/47 C07K14/075 A61K48/00
A61K38/17 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOIKE K ET AL: "Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 417, no. 3, 17 November 1997 (1997-11-17), pages 390-394, XP004261491 ISSN: 0014-5793 page 392, left-hand column, line 7 -page 393, right-hand column, paragraph 2; figures 2,5 -/--	8,9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 May 2002

Date of mailing of the international search report

03.03.02

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rutz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 01/15212

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 56909 A (BRUNORI MICHELE ;IGGO RICHARD (CH); BTG INT LTD (GB)) 28 September 2000 (2000-09-28) page 6, line 17 -page 7, line 17 page 9, line 11 -page 10, line 6 page 12, line 15 -page 13, line 3 page 22, line 10 -page 29, line 11 page 31, line 14 -page 32, line 2; figure 4	10-12
Y	SAFAK MAHMUT ET AL: "Physical and functional interaction between the Y-box binding protein YB-1 and human polyomavirus JC virus large T antigen" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 10146-10157, XP002177057 ISSN: 0022-538X abstract; figures 2-4	39-42
A	the whole document	1-7, 13-46
Y	YUN JEANHO ET AL: "p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 42, 15 October 1999 (1999-10-15), pages 29677-29682, XP002193311 ISSN: 0021-9258 page 29681, right-hand column, paragraph 2	39-42
A	the whole document	1-7, 13-46
A	US 5 856 181 A (MCCORMICK FRANCIS) 5 January 1999 (1999-01-05) column 9, line 50 -column 11, line 52	1-7, 13-46
A	KIRN D ET AL: "ADENOVIRUS E1A MUTANTS THAT SELECTIVELY REPLICATE IN AND CAUSE ENHANCED DESTRUCTION OF CANCER CELLS IN VITRO AND IN NUDE MOUSE-HUMAN TUMOR XENOGRAFTS" CANCER GENE THERAPY, NORWALK, CT, US, vol. 5, no. 6, SUPPL, November 1998 (1998-11), page S26 XP000982296 ISSN: 0929-1903 the whole document	1-7, 13-46

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational Application No

PCT/EP 01/15212

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HEISE ET AL: "ONYX-015, an E+B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 3, no. 6, 1 June 1997 (1997-06-01), pages 639-645, XP002095383 ISSN: 1078-8956 the whole document ---	1-7, 13-46
A	BARGOU RALF C ET AL: "Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 3, no. 4, April 1997 (1997-04), pages 447-450, XP002160622 ISSN: 1078-8956 the whole document ---	1-9, 13-46
A	WO 00 39317 A (MAX DELBRUECK CENTRUM ; ROYER HANS DIETER (DE); WOISCHWILL CHRISTIA) 6 July 2000 (2000-07-06) the whole document ---	1-7, 13-46
A	US 6 140 126 A (COWSERT LEX M ET AL) 31 October 2000 (2000-10-31) column 1, line 49 -column 3, line 40 ---	1-7, 13-46
A	US 6 110 744 A (ROTH JACK A ET AL) 29 August 2000 (2000-08-29) column 2, line 62 -column 3, line 8 column 15, line 14 - line 45 column 21, line 57 -column 22, line 50; tables 1,2 ---	10-12
A	US 5 871 726 A (ENDERSON DANIEL ROBERT ET AL) 16 February 1999 (1999-02-16) column 21, line 50 -column 22, line 54 ---	10-12
A	WO 99 06576 A (CALYDON INC ;SCHUUR ERIC R (US); YU DE CHAO (US); HERDENSEN DANIEL) 11 February 1999 (1999-02-11) page 57, line 27 -page 58, line 4 tables 1,2 --- -/--	10-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational Application No

PCT/EP 01/15212

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RITTNER K ET AL: "Conditional repression of the E2 transcription unit in E1-E3-deleted adenovirus vectors is correlated with a strong reduction in viral DNA replication and late gene expression in vitro"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 71, no. 4, April 1997 (1997-04), pages 3307-3311, XP002130029 ISSN: 0022-538X page 3307, right-hand column, line 1 - line 14; figure 1 page 3308, left-hand column, paragraph 3 -page 3309, right-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p>	10-12
A	<p>FANG B ET AL: "DIMINISHING ADENOVIRUS GENE EXPRESSION AND VIRAL REPLICATION BY PROMOTER REPLACEMENT"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 71, no. 6, 1 June 1997 (1997-06-01), pages 4798-4803, XP002062030 ISSN: 0378-1119 abstract page 4798, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 1 page 4802, right-hand column, line 35 - line 39</p> <p>---</p>	10-12
P,X	<p>DE 100 31 122 A (MAX DELBRUECK CENTRUM) 22 March 2001 (2001-03-22) the whole document</p> <p>---</p>	1-9, 13-46
P,X	<p>DE 199 29 569 A (HOLM PER SONNE) 28 December 2000 (2000-12-28) the whole document</p> <p>-----</p>	1-9, 13-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP01/15212

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely

1. Claims 1-7, 13, 14, 16-18, 34-46 (in full), 15, 19-26, 28-33 (in part)

role of the YB-1 protein in adenovirus replication:

- adenoviral nucleic acids or adenoviral replication systems that contain a nucleic acid sequence coding for YB-1; vectors, adenoviruses, cells, medical uses
- screening for YB-1 expression and localization in connection with adenovirus-mediated gene therapy
- complexes comprising YB-1 proteins and adenoviral proteins (E1B 55kda or E1A)
- use of E1B-deficient adenoviruses in producing a drug for treatment of tumors that have YB-1 at their core

2. Claims 8 and 9 (in full), 15, 19-26 and 28-33 (in part)

nucleic acid comprising a nucleic acid coding for YB-1 and a nucleic acid sequence mediating a core transport of YB-1; vectors, adenoviruses, cells, medical uses

3. Claims 10-12 (in full), 15, 19-26 and 28-33 (in part)

adenoviral nucleic acids with modified or nonfunctional promoters; vectors, adenoviruses, cells, medical uses.

Continuation of I.1

Although Claim 36 relates in part to a diagnostic method practiced on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged properties of the compound or composition.

Although Claims 41 and 44-46 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Continuation of I.1

PCT Rule 39.1(iv) – diagnostic method practiced on the human or animal body

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/15212

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0056909	A	28-09-2000	AU	3445500 A	09-10-2000
			EP	1163355 A1	19-12-2001
			WO	0056909 A1	28-09-2000
US 5856181	A	05-01-1999	US	5677178 A	14-10-1997
			US	5972706 A	26-10-1999
			US	5801029 A	01-09-1998
			US	5846945 A	08-12-1998
			AT	178490 T	15-04-1999
			AT	199568 T	15-03-2001
			AU	682854 B2	23-10-1997
			AU	6272294 A	14-09-1994
			CA	2152941 A1	01-09-1994
			DE	69417734 D1	12-05-1999
			DE	69417734 T2	07-10-1999
			DE	69426841 D1	12-04-2001
			DE	69426841 T2	06-09-2001
			DK	689447 T3	18-10-1999
			DK	931830 T3	11-06-2001
			EP	0689447 A1	03-01-1996
			EP	0931830 A2	28-07-1999
			ES	2134346 T3	01-10-1999
			ES	2157109 T3	01-08-2001
			GR	3030385 T3	30-09-1999
			JP	8507076 T	30-07-1996
			PT	931830 T	30-08-2001
			WO	9418992 A1	01-09-1994
WO 0039317	A	06-07-2000	DE	19860602 A1	06-07-2000
			WO	0039317 A1	06-07-2000
			EP	1141362 A1	10-10-2001
US 6140126	A	31-10-2000	AU	1221201 A	08-05-2001
			WO	0130800 A1	03-05-2001
US 6110744	A	29-08-2000	AU	5253998 A	03-06-1998
			WO	9821350 A1	22-05-1998
US 5871726	A	16-02-1999	US	5698443 A	16-12-1997
			US	6057299 A	02-05-2000
			AU	729648 B2	08-02-2001
			AU	6393296 A	30-01-1997
			CA	2222457 A1	16-01-1997
			EP	0844888 A1	03-06-1998
			JP	11508770 T	03-08-1999
			WO	9701358 A1	16-01-1997
WO 9906576	A	11-02-1999	AU	744725 B2	28-02-2002
			AU	6345098 A	22-09-1998
			AU	8692598 A	22-02-1999
			EP	1007715 A2	14-06-2000
			EP	1002103 A1	24-05-2000
			WO	9839464 A2	11-09-1998
			WO	9906576 A1	11-02-1999
DE 10031122	A	22-03-2001	DE	10031122 A1	22-03-2001
			AU	6425800 A	22-01-2001
			WO	0102556 A2	11-01-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/15212

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19929569	A	28-12-2000	DE 19929569 A1	28-12-2000
			WO 0078327 A2	28-12-2000
			EP 1185279 A2	13-03-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15212

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/861 C12N5/10 C07K14/47 C07K14/075 A61K48/00 A61K38/17 G01N33/53		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOIKE K ET AL: "Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 417, Nr. 3, 17. November 1997 (1997-11-17), Seiten 390-394, XP004261491 ISSN: 0014-5793 Seite 392, linke Spalte, Zeile 7 -Seite 393, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildungen 2,5 --- -/--	8,9
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
6. Mai 2002		03.09.02
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Rutz, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 56909 A (BRUNORI MICHELE ;IGGO RICHARD (CH); BTG INT LTD (GB)) 28. September 2000 (2000-09-28) Seite 6, Zeile 17 -Seite 7, Zeile 17 Seite 9, Zeile 11 -Seite 10, Zeile 6 Seite 12, Zeile 15 -Seite 13, Zeile 3 Seite 22, Zeile 10 -Seite 29, Zeile 11 Seite 31, Zeile 14 -Seite 32, Zeile 2; Abbildung 4	10-12
Y	SAFAK MAHMUT ET AL: "Physical and functional interaction between the Y-box binding protein YB-1 and human polyomavirus JC virus large T antigen" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 73, Nr. 12, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 10146-10157, XP002177057 ISSN: 0022-538X Zusammenfassung; Abbildungen 2-4	39-42
A	das ganze Dokument	1-7, 13-46
Y	YUN JEANHO ET AL: "p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 274, Nr. 42, 15. Oktober 1999 (1999-10-15), Seiten 29677-29682, XP002193311 ISSN: 0021-9258 Seite 29681, rechte Spalte, Absatz 2	39-42
A	das ganze Dokument	1-7, 13-46
A	US 5 856 181 A (MCCORMICK FRANCIS) 5. Januar 1999 (1999-01-05) Spalte 9, Zeile 50 -Spalte 11, Zeile 52	1-7, 13-46
A	KIRN D ET AL: "ADENOVIRUS E1A MUTANTS THAT SELECTIVELY REPLICATE IN AND CAUSE ENHANCED DESTRUCTION OF CANCER CELLS IN VITRO AND IN NUDE MOUSE-HUMAN TUMOR XENOGRAFTS" CANCER GENE THERAPY, NORWALK, CT, US, Bd. 5, Nr. 6, SUPPL, November 1998 (1998-11), Seite S26 XP000982296 ISSN: 0929-1903 das ganze Dokument	1-7, 13-46

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HEISE ET AL: "ONYX-015, an E+B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, Bd. 3, Nr. 6, 1. Juni 1997 (1997-06-01), Seiten 639-645, XP002095383 ISSN: 1078-8956 das ganze Dokument	1-7, 13-46
A	--- BARGOU RALF C ET AL: "Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, Bd. 3, Nr. 4, April 1997 (1997-04), Seiten 447-450, XP002160622 ISSN: 1078-8956 das ganze Dokument	1-9, 13-46
A	--- WO 00 39317 A (MAX DELBRUECK CENTRUM ;ROYER HANS DIETER (DE); WOISCHWILL CHRISTIA) 6. Juli 2000 (2000-07-06) das ganze Dokument	1-7, 13-46
A	--- US 6 140 126 A (COWSERT LEX M ET AL) 31. Oktober 2000 (2000-10-31) Spalte 1, Zeile 49 -Spalte 3, Zeile 40	1-7, 13-46
A	--- US 6 110 744 A (ROTH JACK A ET AL) 29. August 2000 (2000-08-29) Spalte 2, Zeile 62 -Spalte 3, Zeile 8 Spalte 15, Zeile 14 - Zeile 45 Spalte 21, Zeile 57 -Spalte 22, Zeile 50; Tabellen 1,2	10-12
A	--- US 5 871 726 A (HENDERSON DANIEL ROBERT ET AL) 16. Februar 1999 (1999-02-16) Spalte 21, Zeile 50 -Spalte 22, Zeile 54	10-12
A	--- WO 99 06576 A (CALYDON INC ;SCHUUR ERIC R (US); YU DE CHAO (US); HERDENSON DANIEL) 11. Februar 1999 (1999-02-11) Seite 57, Zeile 27 -Seite 58, Zeile 4 Tabellen 1,2	10-12
	--- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>RITTNER K ET AL: "Conditional repression of the E2 transcription unit in E1-E3-deleted adenovirus vectors is correlated with a strong reduction in viral DNA replication and late gene expression in vitro"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, Bd. 71, Nr. 4, April 1997 (1997-04), Seiten 3307-3311, XP002130029 ISSN: 0022-538X Seite 3307, rechte Spalte, Zeile 1 - Zeile 14; Abbildung 1 Seite 3308, linke Spalte, Absatz 3 -Seite 3309, rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	10-12
A	<p>FANG B ET AL: "DIMINISHING ADENOVIRUS GENE EXPRESSION AND VIRAL REPLICATION BY PROMOTER REPLACEMENT"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, Bd. 71, Nr. 6, 1. Juni 1997 (1997-06-01), Seiten 4798-4803, XP002062030 ISSN: 0378-1119 Zusammenfassung Seite 4798, linke Spalte, Absatz 3 -rechte Spalte, Absatz 1 Seite 4802, rechte Spalte, Zeile 35 - Zeile 39</p> <p>---</p>	10-12
P,X	<p>DE 100 31 122 A (MAX DELBRUECK CENTRUM) 22. März 2001 (2001-03-22) das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-9, 13-46
P,X	<p>DE 199 29 569 A (HOLM PER SONNE) 28. Dezember 2000 (2000-12-28) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-9, 13-46

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/15212

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: —

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-7, 13, 14, 16-18, 27, 34-46 (vollständig), 15, 19-26, 28-33 (teilweise)

Rolle des YB-1 Proteins für die Adenovirusreplikation:

- adenovirale Nukleinsäuren oder adenovirale Replikationssysteme, die eine für YB-1 codierende Nukleinsäuresequenz enthalten; Vektoren, Adenoviren, Zellen, medizinische Verwendungen
- Screening für YB-1 Expression und Lokalisation im Zusammenhang mit Adenovirus-vermittelter Gentherapie
- Komplexe, umfassend YB-1 und adenovirale Proteine (E1B 55kDa oder E1A)
- Verwendung von E1B-defizienten Adenoviren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren, die YB-1 im Kern aufweisen

2. Ansprüche: 8, 9 (vollständig), 15, 19-26, 28-33 (teilweise)

Nukleinsäure, umfassend eine für YB-1 codierende Nukleinsäure und eine einen Kerntransport von YB-1 vermittelnde Nukleinsäuresequenz; Vektoren, Adenoviren, Zellen, medizinische Verwendungen

3. Ansprüche: 10-12 (vollständig), 15, 19-26, 28-33 (teilweise)

adenovirale Nukleinsäuren mit modifizierten oder nicht-funktionalen Promotern; Vektoren, Adenoviren, Zellen, medizinische Verwendungen

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl der Anspruch 36 sich zum Teil auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Obwohl die Ansprüche 41, 44-46 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.1

Regel 39.1(iv) PCT - Diagnostizierverfahren, die am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen werden

Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15212

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0056909	A	28-09-2000	AU 3445500 A	09-10-2000
			EP 1163355 A1	19-12-2001
			WO 0056909 A1	28-09-2000
US 5856181	A	05-01-1999	US 5677178 A	14-10-1997
			US 5972706 A	26-10-1999
			US 5801029 A	01-09-1998
			US 5846945 A	08-12-1998
			AT 178490 T	15-04-1999
			AT 199568 T	15-03-2001
			AU 682854 B2	23-10-1997
			AU 6272294 A	14-09-1994
			CA 2152941 A1	01-09-1994
			DE 69417734 D1	12-05-1999
			DE 69417734 T2	07-10-1999
			DE 69426841 D1	12-04-2001
			DE 69426841 T2	06-09-2001
			DK 689447 T3	18-10-1999
			DK 931830 T3	11-06-2001
			EP 0689447 A1	03-01-1996
			EP 0931830 A2	28-07-1999
			ES 2134346 T3	01-10-1999
			ES 2157109 T3	01-08-2001
			GR 3030385 T3	30-09-1999
			JP 8507076 T	30-07-1996
			PT 931830 T	30-08-2001
			WO 9418992 A1	01-09-1994
WO 0039317	A	06-07-2000	DE 19860602 A1	06-07-2000
			WO 0039317 A1	06-07-2000
			EP 1141362 A1	10-10-2001
US 6140126	A	31-10-2000	AU 1221201 A	08-05-2001
			WO 0130800 A1	03-05-2001
US 6110744	A	29-08-2000	AU 5253998 A	03-06-1998
			WO 9821350 A1	22-05-1998
US 5871726	A	16-02-1999	US 5698443 A	16-12-1997
			US 6057299 A	02-05-2000
			AU 729648 B2	08-02-2001
			AU 6393296 A	30-01-1997
			CA 2222457 A1	16-01-1997
			EP 0844888 A1	03-06-1998
			JP 11508770 T	03-08-1999
			WO 9701358 A1	16-01-1997
WO 9906576	A	11-02-1999	AU 744725 B2	28-02-2002
			AU 6345098 A	22-09-1998
			AU 8692598 A	22-02-1999
			EP 1007715 A2	14-06-2000
			EP 1002103 A1	24-05-2000
			WO 9839464 A2	11-09-1998
			WO 9906576 A1	11-02-1999
DE 10031122	A	22-03-2001	DE 10031122 A1	22-03-2001
			AU 6425800 A	22-01-2001
			WO 0102556 A2	11-01-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

tionales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15212

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19929569 A	28-12-2000	DE 19929569 A1	28-12-2000
		WO 0078327 A2	28-12-2000
		EP 1185279 A2	13-03-2002